

STABILIZED AQUEOUS NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE SOLUTIONPatent Number: ☐ US2002004230

Publication date: 2002-01-10

Inventor(s): IHLENFELDT HANS-GEORG (DE); LEITENBERGER VOLKER (DE); MUHLEGGER KLAUS (DE); SCHMIDT AXEL (DE)

Applicant(s):

Requested Patent: ☐ WO9821362

Application Number: US19990308034 19991119

Priority Number (s): DE19961047055 19961114

IPC

Classification: C07H21/02; C07H21/04; C12P19/38; C12P19/34

EC

Classification: C12Q1/68, C12Q1/68A4, C12Q1/68D2, C12Q1/68D4Equivalents: AU5321398, AU737546, CN1238012, CZ9901678, ☐ DE19647055, ☐ EP0941370 (WO9821362), A3, B1, JP2001503764T, NZ335426, PL333362, ZA9710230**Abstract**

The invention concerns stable aqueous solutions containing one or several nucleoside triphosphates wherein the respective solution has a pH value of more than 7.5 and contains no additional substances with a stabilizing effect. The nucleoside triphosphate solutions are used in particular for DNA synthesizing reactions such as e.g. RT-PCR, cycle sequencing, random priming and nick translation. One of the most important applications of such solutions containing deoxynucleoside triphosphates (d-NTP) is their use in the polymerase chain reaction (PCR)

Data supplied from the esp@cenet database - I2



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/21362 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Mai 1998 (22.05.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06276 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. November 1997 (11.11.97) (30) Prioritätsdaten: 196 47 055.2 14. November 1996 (14.11.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): IHLENFELDT, Hans-Georg [DE/DE]; Rabenkopfstrasse 5, D-82393 Iffeldorf (DE). SCHMIDT, Axel [DE/DE]; Gudrunstrasse 18, D-80634 München (DE). MÜHLEGGGER, Klaus [DE/DE]; Römerstrasse 7, D-82398 Polling (DE). LEITENBERGER, Volker [DE/DE]; Tannenstrasse 20, D-82402 Seeshaupt (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, IL, JP, KR, MX, NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: STABILIZED AQUEOUS NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE SOLUTION (54) Bezeichnung: STABILISIERTE WÄSSRIGE NUKLEOSIDTRIPHOSPHAT-LÖSUNGEN (57) Abstract <p>The invention relates to stable aqueous solutions containing one or more nucleoside triphosphates, wherein each solution has a pH value higher than 7.5 and no additional stabilizing substances. The nucleoside triphosphate solutions are specially used for DNA synthesizing reactions, for instance Rt-PCR, cycle sequencing, random priming and nick translation. One of the most important applications of corresponding solutions containing deoxy-nucleoside triphosphate (d-NTP) is their use in the polymerase chain reaction (PCR).</p> <p>(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft stabile wässrige Lösungen enthaltend ein oder mehrere Nukleosidtriphosphate, wobei die jeweilige Lösung einen pH-Wert von größer als 7,5 und keinerlei zusätzlicher stabilisierend wirkender Substanzen aufweist. Die Nukleosidtriphosphatlösungen werden insbesondere für DNA-aufbauende Reaktionen wie z.B. die RT-PCR, Cycle Sequencing, Random Priming und die Nick-Translation verwendet. Eine der wichtigsten Anwendungen entsprechender Lösungen enthaltend Desoxy-Nukleosidtriphosphate (d-NTP) ist ihr Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).</p></p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5 Stabilisierte wässrige Nukleosidtriphosphat-Lösungen

Die Erfindung betrifft stabile wässrige Lösungen enthaltend Nukleosidtriphosphate, wobei die Lösung einen pH-Wert über 7,5 aufweist.

10

Nukleosidtriphosphate (NTP), wie Ribonukleosid-, Desoxy- und Didesoxynukleosidtriphosphate werden auf dem Gebiet der Biochemie und der Molekularbiologie vielfältig eingesetzt.

Die Anwendungen betreffen zum großen Teil DNA- und RNA- aufbauende bzw. DNA- und RNA- vervielfältigende Reaktionen wie z.B. die Reverse Transkriptase-Polymeraseketten-

15

reaktion (RT-PCR), cycle Sequencing und die Nick-Translation. Bei der RT-PCR werden beispielsweise durch die Reverse Transkriptase in 5'-3'-Richtung DNA-Ketten synthetisiert,

wobei als Matrix ein RNA-Strang dient. Bestimmte NTPs wie z.B. Didesoxy-Nukleosidtriphosphate (dd-NTP) können als Kettenterminatoren bei der Sequenzierung von DNA eingesetzt werden. Eine der wichtigsten Anwendungen für Desoxy-Nukleosidtriphosphate (d-

20

NTP) ist der Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Stabilität der NTP-Lösungen ist dabei vor allem während der Lagerung unbedingt erforderlich. Die d-NTPs (d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP, d-UTP u.a.) werden üblicherweise als Na- oder Li-Salze und typischerweise in Konzentrationen von 0,1 mol/l aufbewahrt und in dieser Form kommerziell angeboten. Die pH-Werte liegen in der Regel bei physiologischem pH-Werten, d.h. zwischen

25

ca. 7,0 bis 7,5.

Der Nachteil der derzeit zur Verfügung stehenden, d.h. käuflich zu erwerbenden NTP-Lösungen besteht insbesondere in der Instabilität der NTPs bei Lagerung bzw. thermischer Belastung. Die NTPs neigen dazu, sich im Laufe der Zeit zu den entsprechenden Diphosphaten

30

bzw. Monophosphaten zu zersetzen. Insbesondere bei höheren Temperaturen nimmt der Triphosphatgehalt ab. Um ca. 2-3% nimmt der Triphosphatgehalt bereits bei einem pH-Wert von ca. 7,5 und bei einer Temperatur von 35°C innerhalb von 10 Tagen ab. Dahingegen ist bei

Raumtemperatur nach 6 Wochen lediglich eine Abnahme des Triphosphatgehaltes von ca. 1% zu beobachten. Der Zerfall der Triphosphate in wäßriger Lösung limitiert somit die Haltbarkeit der NTP-Lösungen. Daher gewähren z.B. die Anbieter von d-NTPs eine Haltbarkeit von d-NTP-Lösungen von lediglich zwölf Monaten. Es besteht jedoch der Bedarf an wässrigen

5 Lösungen, die lediglich d-NTP und dies in hohen Konzentrationen aufweisen, die eine höhere Langzeitstabilität als die gegenwärtig zur Verfügung stehenden Lösungen aufweisen.

Versuche eine verbesserte Stabilität von Triphosphaten zu erreichen, bezogen sich bisher ausschließlich auf entsprechende Adenosintriphosphat-Lösungen. Die Stabilität des Adenosintriphosphates wurde dabei in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Dabei wurde gemäß dem

10 Stand der Technik die Anwesenheit von Stabilisatoren als unbedingt erforderlich beschrieben. So wird die Stabilität von Adenosintriphosphat in wäßriger Lösung bei einem pH-Wert von vorzugsweise 8,3 bis 9,2 als optimal in Gegenwart von EDTA beschrieben (JP 64/003444). In Gegenwart der Stabilisatoren wie Guanidin / Aminoguanidin bzw. Creatinin wird ein pH-

15 Wert von 9 bis 10 (JP 71/038270 bzw. JP 71/033592), in Gegenwart von Methionin als Stabilisator ein pH-Wert von vorzugsweise 9 bis 10,5 (JP 67/019115), in Gegenwart der Stabilisatoren Phosphat und Sorbitol/Mannitol/Glycerol/Benzyl-Alkohol/PEG ein pH-Wert von 8 bis 11 (JP 67/015115) und in Gegenwart von Glycerol/ H_3PO_4 ein pH-Wert von 3,7 (FR4078) beschrieben. Die Anwesenheit von Stabilisatoren in wäßrigen d-NTP-Lösungen kann jedoch

20 für viele Anwendungen kritisch bzw. störend sein.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand daher darin, eine stabilisierte wässrige Lösung enthaltend NTP's ohne den Zusatz von irgend welchen Stabilisatoren zur Verfügung zu stellen.

25 Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß wäßrige NTP-Lösungen einen pH-Wert von über ungefähr 7,5 aufweisen. Zu diesen Nukleotidtriphosphaten zählen Ribonukleosid-, Desoxy- und Didesoxynukleotidtriphosphate, wobei als Basen sowohl die fünf natürlich vorkommenden, als auch modifizierte Basen wie z.B. Isoguanine, Deazaverbindungen sowie deren Derivate in Frage kommen. Die Nukleosidtriphosphate können zudem

30 mit Reportergruppen markiert sein. In der Regel weisen die erfindungsgemäßen Lösungen einen pH-Wert in einem Bereich von größer als 7,5 bis maximal 11 auf. Als besonders vor-

teilhaft erwies sich ein pH-Wert von ca. 8 bis 10. Die Einstellung des pH-Wertes kann sowohl durch Basenzugabe (z.B. NaOH, KOH, LiOH) als auch durch Zugabe eines Puffers (z.B. Tris-Puffer, Na-Carbonat-Puffer, Phosphatpuffer) erfolgen.

- 5 Die Konzentration der NTP-Lösung beträgt vorteilhafterweise zwischen ca. 2 mmol/l und 200 mmol/l. Besonders bevorzugt ist eine Konzentration der NTPs von ca. 100 bis 150 mmol/l.

- Ein besonders wichtiger Bestandteil dieser Erfindung sind stabile d-NTP-Lösungen. Die Stabilität dieser Lösungen erscheint vor allem im Hinblick auf die Anwendung in der Poly-
10 merase-Kettenreaktion von Vorteil. Der pH-Wert der d-NTP-Lösung liegt in der Regel über ca. 7,5 und unter ca. pH 11. Als besonders vorteilhaft erwies sich ein pH-Wert zwischen ca. 8 bis 10. Die Konzentration der stabilen d-NTP-Lösung beträgt zwischen 2 mmol/l und 200 mmol/l. Besonders bevorzugt ist eine Konzentration der d-NTPs von 100 bis 150 mmol/l.
- 15 Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß die Stabilität der NTPs ohne den Zusatz irgendwelcher Stabilisatoren bei pH-Werten von größer als 7,5 in wäßriger Lösung höher ist als in den bisher bekannten Lösungen, die einen pH-Wert von ca. 7,0 bis 7,5 aufweisen. Die Stabilität der d-NTPs in wäßriger Lösung erreicht ein Optimum bei einem pH-Wert von ca. 8 bis 10. Die Erhöhung des pH-Wertes ruft keine zusätzlichen Abbaureaktionen hervor, d.h. das Muster
20 der Abbauprodukte bleibt bei den erfindungsgemäßen pH-Werten unverändert. Die Abbaureaktionen verlaufen sogar überraschenderweise bei höheren pH-Werten, wie beispielsweise 8,3 erheblich langsamer als bei physiologischen pH-Werten, wie beispielsweise 7,5.

- Somit hat sich gezeigt, daß bei erhöhten pH-Werten keinerlei Nebenprodukte entstehen, die
25 die Verwendung der d-NTPs z.B. für die PCR-Reaktion beeinträchtigen könnten. Selbst nach ca. 90 Tagen bei einer Temperatur von 35°C ist der PCR-Funktionstest positiv. Der höhere pH-Wert ist für die PCR selbst unkritisch, da die meisten PCR-Amplifikationen sowieso bei pH-Werten größer als 8,0 durchgeführt werden. Somit erweisen sich beispielsweise wäßrige d-NTP-Lösungen, deren pH-Wert größer als ca. 7,5 und kleiner/gleich ca. 11 ist, zum einen
30 als stabil und als vorteilhaft für die Verwendung für die PCR-Reaktion. Als besonders vorteilhaft erwies sich hier ein pH-Wert der d-NTP-Lösung zwischen 8 und 10.

Die erfindungsgemäßen stabilen NTP-Lösungen können für alle DNA- und RNA aufbauende bzw. DNA- und RNA vervielfältigende Reaktionen verwendet werden. Insbesondere kann die erfindungsgemäße stabile NTP-Lösung auch für die RT-PCR, für Nick Translation, Random Priming und für die Sequenzierung (cycle Sequencing) verwendet werden. Weiterhin er-
5 wiesen sich die erfindungsgemäßen stabilen NTP-Lösungen vorteilhaft im Hinblick auf eine längere Verwendungsdauer der NTPs. Das heißt, daß die erfindungsgemäßen stabilen Lösungen wesentlich länger gelagert werden können als die bisher verwendeten d-NTP-Lösungen.

10

Erläuterungen der Abbildungen

Abbildung 1: Abnahme des d-GTP-Gehaltes

Die Abnahme der d-GTP-Konzentration bei einer Temperatur von 35°C wurde
15 über einen Zeitraum von 140 Tagen bei pH-Werten von 7,5; 7,9 bzw. 8,4 verfolgt.

Abbildung 2: Abnahme des d-CTP-Gehaltes

Die Abnahme der d-CTP-Konzentration bei einer Temperatur von 35°C wurde
20 über einen Zeitraum von 90 Tagen bei pH-Werten von 7,5; 7,9 bzw. 8,3 verfolgt.

Abbildung 3: Abnahme des d-TTP-Gehaltes

Die Abnahme der d-TTP-Konzentration bei einer Temperatur von 35°C wurde
25 über einen Zeitraum von 90 Tagen bei pH-Werten von 7,5; 7,9 bzw. 8,3 verfolgt.

Abbildung 4: Abnahme des d-UTP-Gehaltes

Die Abnahme der d-UTP-Konzentration bei einer Temperatur von 35°C wurde
30 über einen Zeitraum von 90 Tagen bei pH-Werten von 7,5; 7,9 bzw. 8,3 verfolgt.

Abbildung 5: Abnahme des d-ATP-Gehaltes

Die Abnahme der d-ATP-Konzentration bei einer Temperatur von 35°C wurde über einen Zeitraum von 65 Tagen bei pH-Werten von 7,5; 7,9 bzw. 8,4 verfolgt.

5

Abbildung 6: Triphosphatgehalt in Abhängigkeit vom pH-Wert

Abbildung 7: pH-Abhängigkeit der Stabilität von UTP

10 Abbildung 8: pH-Abhängigkeit der Stabilität von UDP

Abbildung 9: pH-Abhängigkeit der Stabilität von ATP

Abbildung 10: pH-Abhängigkeit der Stabilität von ADP

15

Abbildung 11: pH-Abhängigkeit der Stabilität von 7-deaza-deoxy-GTP

Abbildung 12: pH-Abhängigkeit der Stabilität von 7-deaza-deoxy-GTP

20 Abbildung 13: die Abhängigkeit der Stabilität von dATP von der Konzentration der Lösung
bei pH=8,3 wobei c=100 mmol/l, 10 mmol/l und 2 mmol/l

Abbildung 14: die Abhängigkeit der Stabilität von dATP von der Konzentration der Lösung
bei pH=8,3 wobei c=100 mmol/l, 10 mmol/l und 2 mmol/l.

25

Abbildung 15: die Abhängigkeit der Stabilität von dCTP von der Konzentration der Lösung
bei pH=8,3 wobei c=100 mmol/l, 10 mmol/l und 2 mmol/l.

Abbildung 16: die Abhängigkeit der Stabilität von dCTP von der Konzentration der Lösung
30 bei pH=8,3 wobei c=100 mmol/l, 10 mmol/l und 2 mmol/l.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1:

5 Herstellung einer erfindungsgemäßen stabilen d-NTP-Lösung

d-NTPs wurden über Anionenchromatographie mit Hilfe eines Salzgradienten aufgereinigt und durch Umkehrosmose entsalzt. Zur Entfernung von DNAsen/RNAsen schließt sich eine Ultrafiltration an (Ausschlußgrenze 1000 - 5000 D). Die Konzentration der Lösung wird dann
10 mit Steril-Wasser typischerweise auf 100 mM eingestellt. Der pH-Wert wird durch Zugabe von Basen (Alkali/Erdalkali/Ammonium-Hydroxid; Amine), wie in der Regel NaOH auf den entsprechenden pH-Wert (>7,5) eingestellt.

15 Beispiel 2:

Abbau des Triphosphates bei verschiedenen pH-Werten

d-NTP-Lösungen der Konzentration 100 bis 110 mmol/l wurden mit Natronlauge auf pH-
20 Werte zwischen 7,5 und 8,3 eingestellt. Die Probe wurde bei 35°C, 22°C, 4°C und -20°C gelagert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reinheit mittels HPLC untersucht. Der Anteil des Tri-, Di-, und Monophosphatgehaltes sowie der freien Base wurde durch Integration der Flächen bestimmt.

25 Die Abnahme des Triphosphatgehaltes ist pH-abhängig. Bei allen untersuchten Nukleotiden ist die Abnahme bei ca. pH 8,3 am langsamsten. (Abb. 1-5)

D.h. selbst bei höheren pH-Werten wie 8,3 sind keine zusätzlichen Peaks, die auf Zer-
setzungsprodukte schließen ließen, im HPLC-Chromatogramm zu sehen.

30

Beispiel 3:

Bestimmung des pH-Optimums der d-NTPS

- 5 d-NTP-Lösungen (dCTP, dTTP, dUTP) der Konzentration 100 bis 110 mmol/l wurden mit Natronlauge auf pH-Werte zwischen 7,5 und 12 (d-ATP, dGTP nicht pH 7,9 und 8,3) eingestellt. Die Probe wurde bei 35°C 35 Tage belastet und anschließend die Reinheit mittels HPLC untersucht. Der Anteil des Tri-, Di-, und Monophosphatgehaltes sowie der freien Base wurde durch Integration der Flächen bestimmt.

10

Bei allen untersuchten d-NTPs liegt das Optimum in einem Bereich zwischen pH 9,0 und 11,0. Bis pH 12 tritt nur geringfügiger Abbau ein (Ausnahme d-CTP, das bei pH 12 desaminiert wird, wodurch d-UTP entsteht) (siehe Abb. 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

15

Beispiel 4:

Berechnung der Stabilisierung von d-NTPs bei pH 8,3 im Vergleich mit pH 7,5

- 20 Aus drei unabhängigen Belastungsversuchen von d-NTPs bei pH 8,3 und 7,5 bei 35°C mit Probennahmen in Zeiträumen zwischen 7 und 89 Tagen wurde die Stabilisierung nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{\Delta\text{Gehalt}(\text{pH}8,3) - \Delta\text{Gehalt}(7,5)}{\Delta\text{Gehalt}(\text{pH}7,5)} \times 100$$

25

Mit $\Delta\text{Gehalt}(\text{pH}...) = \text{Gehalt}(t=0) - \text{Gehalt}(t)$

Für die einzelnen Nukleotide ergaben sich folgende Stabilisierungen in Prozent bei einem pH-Wert von 7,5 im Vergleich zu einem pH-Wert von 8,3 (Tabelle 1):

Tabelle 1:

5

Nucleotid	Mittelwert	Maximalwert	Minimalwert
d-ATP	19%	33%	9%
d-CTP	20 %	37%	10%
d-GTP	21%	30%	12%
d-TTP	5%	17%	26%
d-UTP	5%	15%	25%

Beispiel 5:

10 Stabilisierung bei Raumtemperatur

Nach 204 Tagen (20°C) zeigt sich der Unterschied der pH-Stabilisierung (im Echtzeitmodell).

Bei d-ATP-Lösungen nimmt der Triphosphatgehalt beispielsweise bei pH 7,5 um ca. 7,6 %, bei pH 8,3 um ca. 6,3% ab (Differenz 17 %).

15 Bei d-GTP-Lösungen nimmt der Triphosphatgehalt beispielsweise bei pH 7,5 um ca. 6,8%, bei pH 8,3 um ca. 5,2 % ab (Differenz 23%)

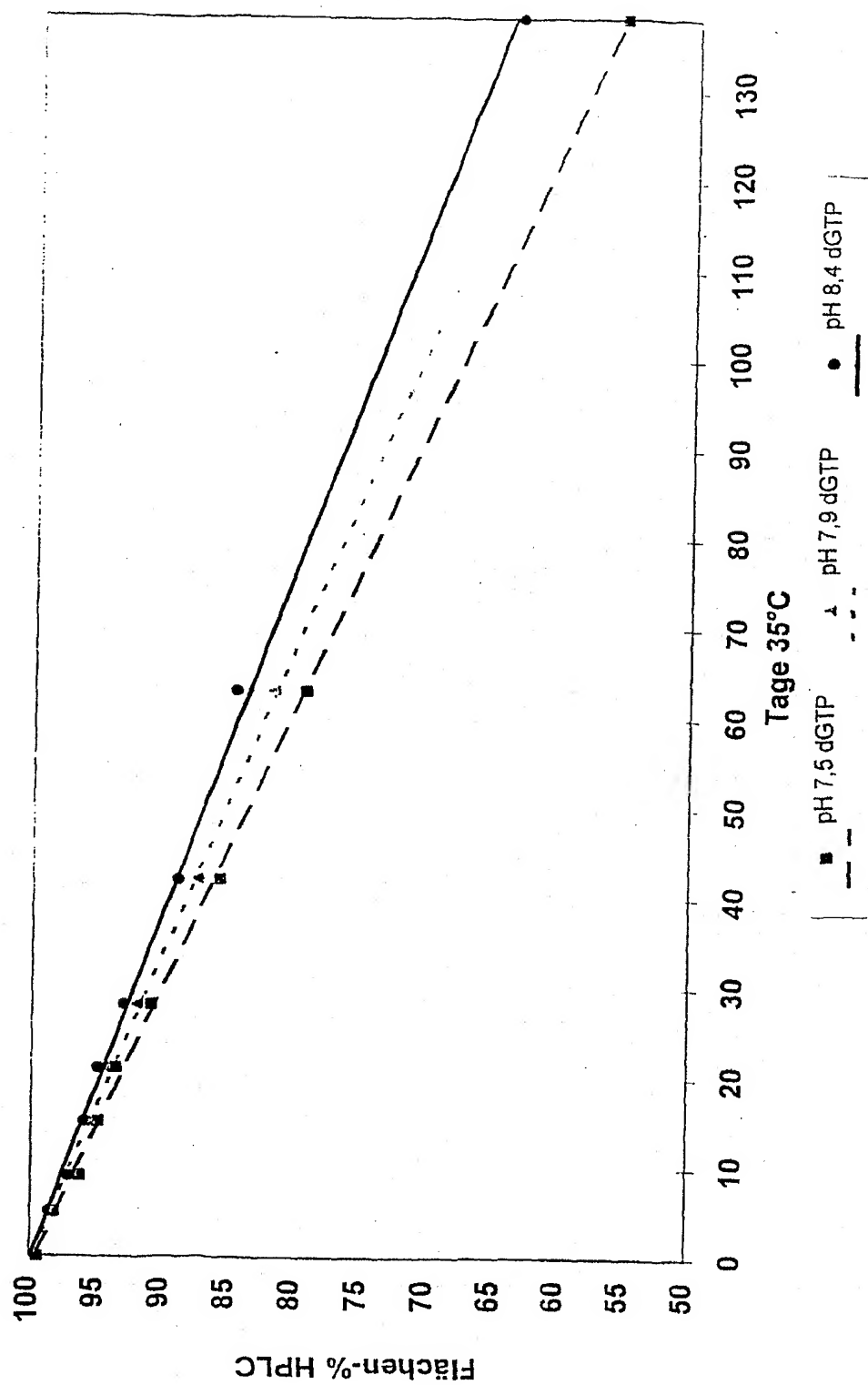
Patentansprüche

1. Stabile wäßrige Lösung enthaltend Nukleosidtriphosphate, wobei der pH-Wert der Lösung über ca. 7,5 liegt.
5
2. Stabile wäßrige Lösung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Nukleosidtriphosphaten um modifizierte Nukleosidtriphosphate handelt.
3. Stabile wäßrige Lösung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der pH-Wert in einem Bereich zwischen 7,5 und 11 liegt.
10
4. Stabile wäßrige Lösung gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die Konzentrationen der Nukleosidtriphosphate ca. 2 bis 200 mmol/l beträgt.
- 15 5. Stabile wäßrige Lösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Lösung Desoxy-Nukleosidtriphosphate enthält.
6. Stabile wäßrige Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 5 enthaltend eine bei bzw. über pH 7,5 puffernde Substanz.
- 20 7. Stabile wäßrige Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 6, die frei von weiteren stabilisierenden Agenzien ist.
8. Verwendung einer stabilen wäßrigen Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 7 zu einer
25 DNA- und/oder RNA- aufbauenden Reaktion.
9. Verwendung einer stabilen wäßrigen Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 7 zur Vervielfältigung von DNA- und/oder RNA-Sequenzen bzw. -Fragmenten.
- 30 10. Verwendung einer stabilen wäßrigen Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 7 zur spezifischen Vervielfältigung von Nukleinsäurefragmenten in Gegenwart eines Enzyms mit reverser Transkriptase-Aktivität.

11. Verwendung einer stabilen wäßrigen Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 7 zum cycle Sequencing von Nukleinsäuren.
12. Verwendung einer stabilen wäßrigen Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 7 zur spezifischen Vervielfältigung von Desoxynukleinsäuresequenzen bzw. -fragmenten.
13. Verwendung einer stabilen wäßrigen Lösung gemäß der Ansprüche 1 bis 7 zum Random Priming.
14. Verwendung einer stabilen wäßrigen Lösung, gemäß der Ansprüche 1 bis 7 zur Nick Translation.

1 / 1 6

Abb. 1
Abnahme d-GTP



2 / 16

Abb. 2
Abnahme d-CTP

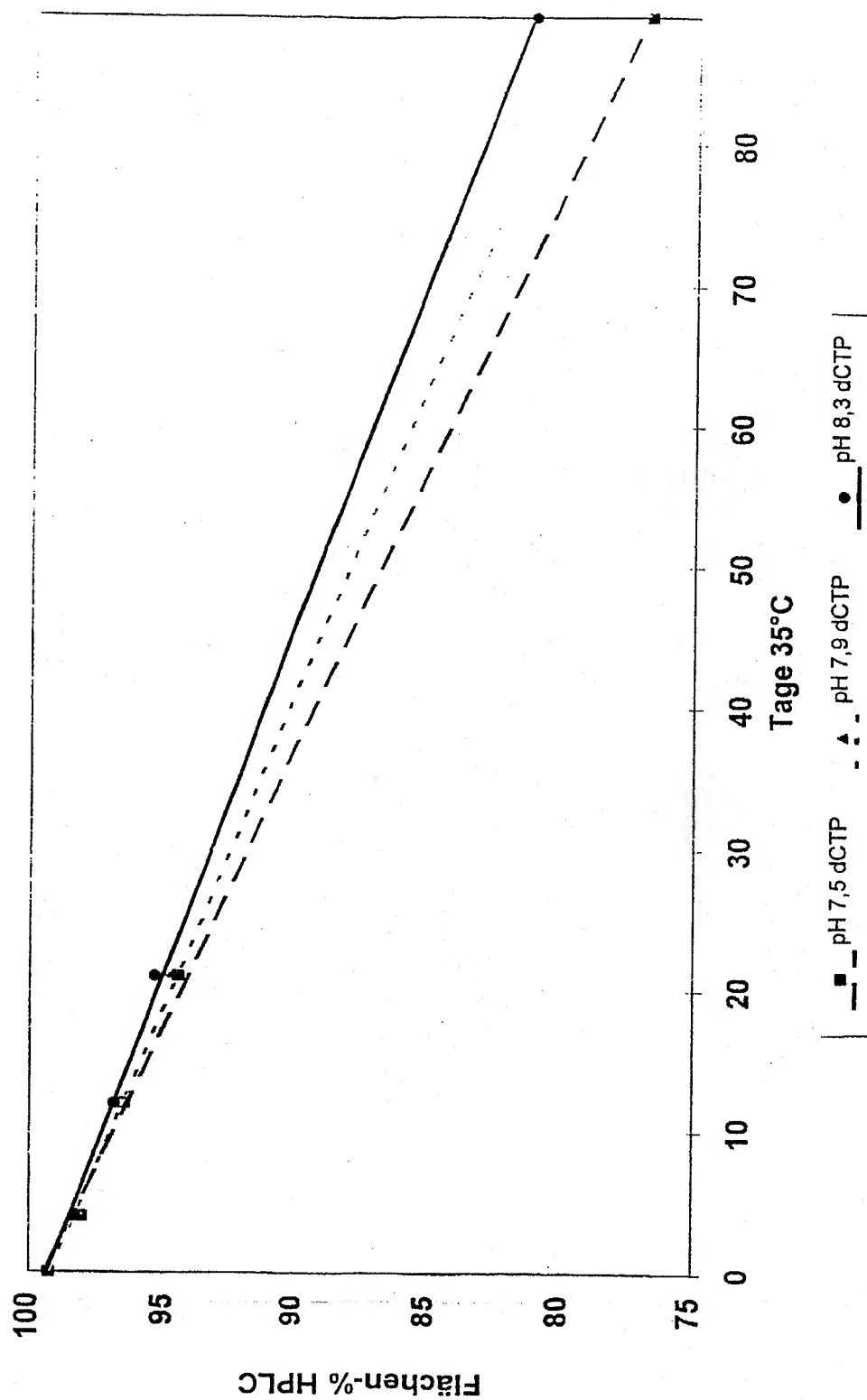


Abb. 3
Abnahme d-TTP

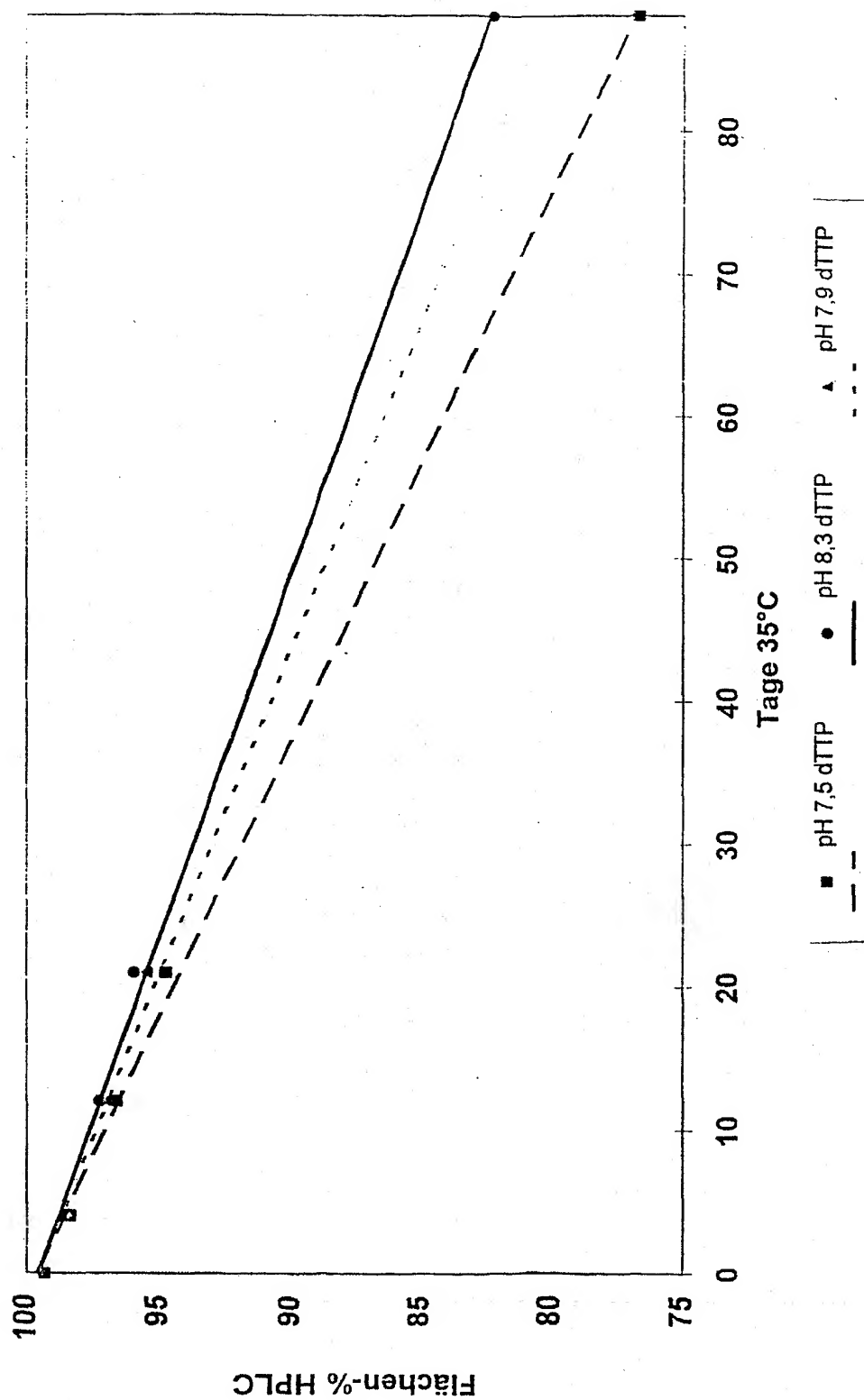
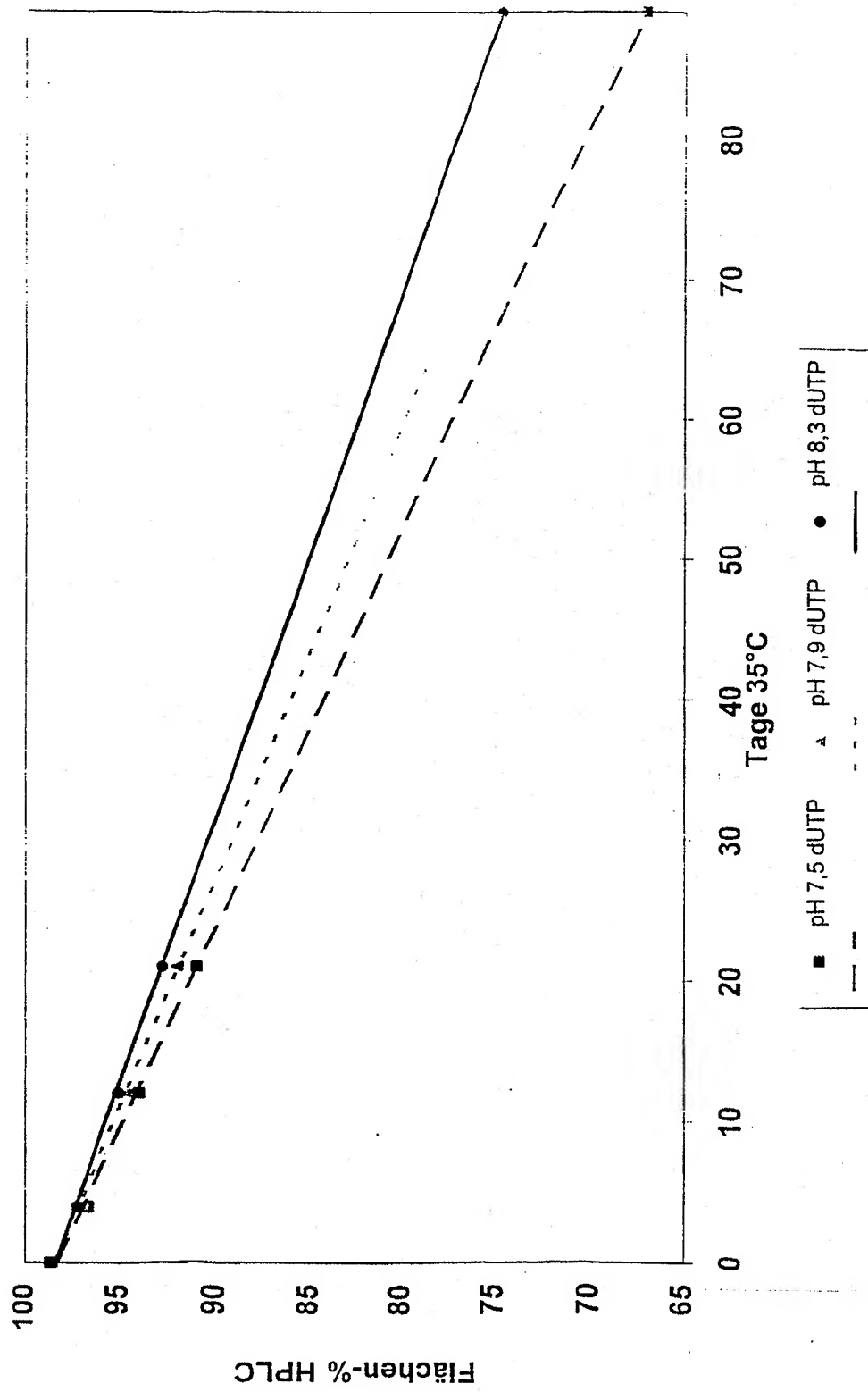
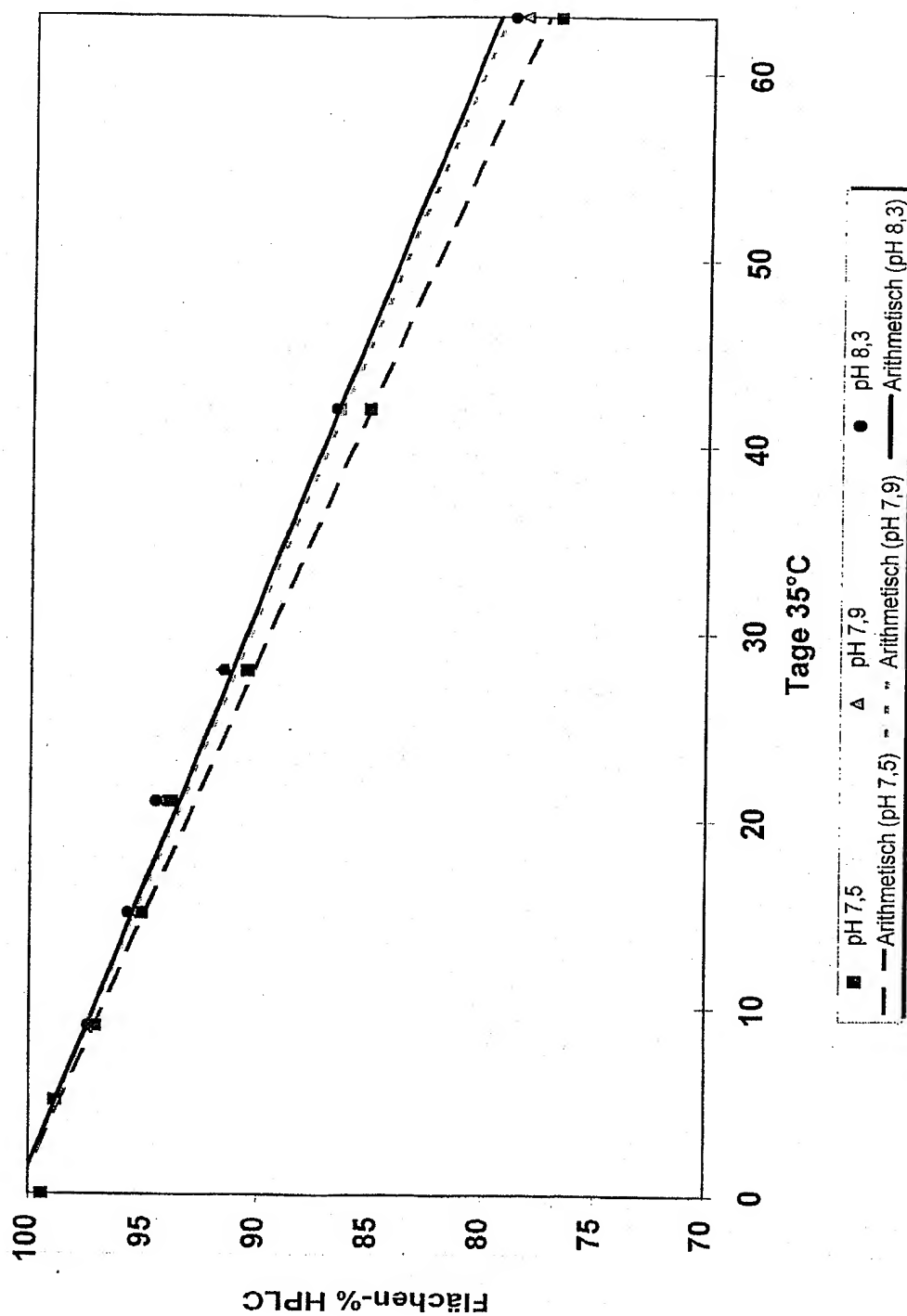


Abb. 4
Abnahme d-UTP



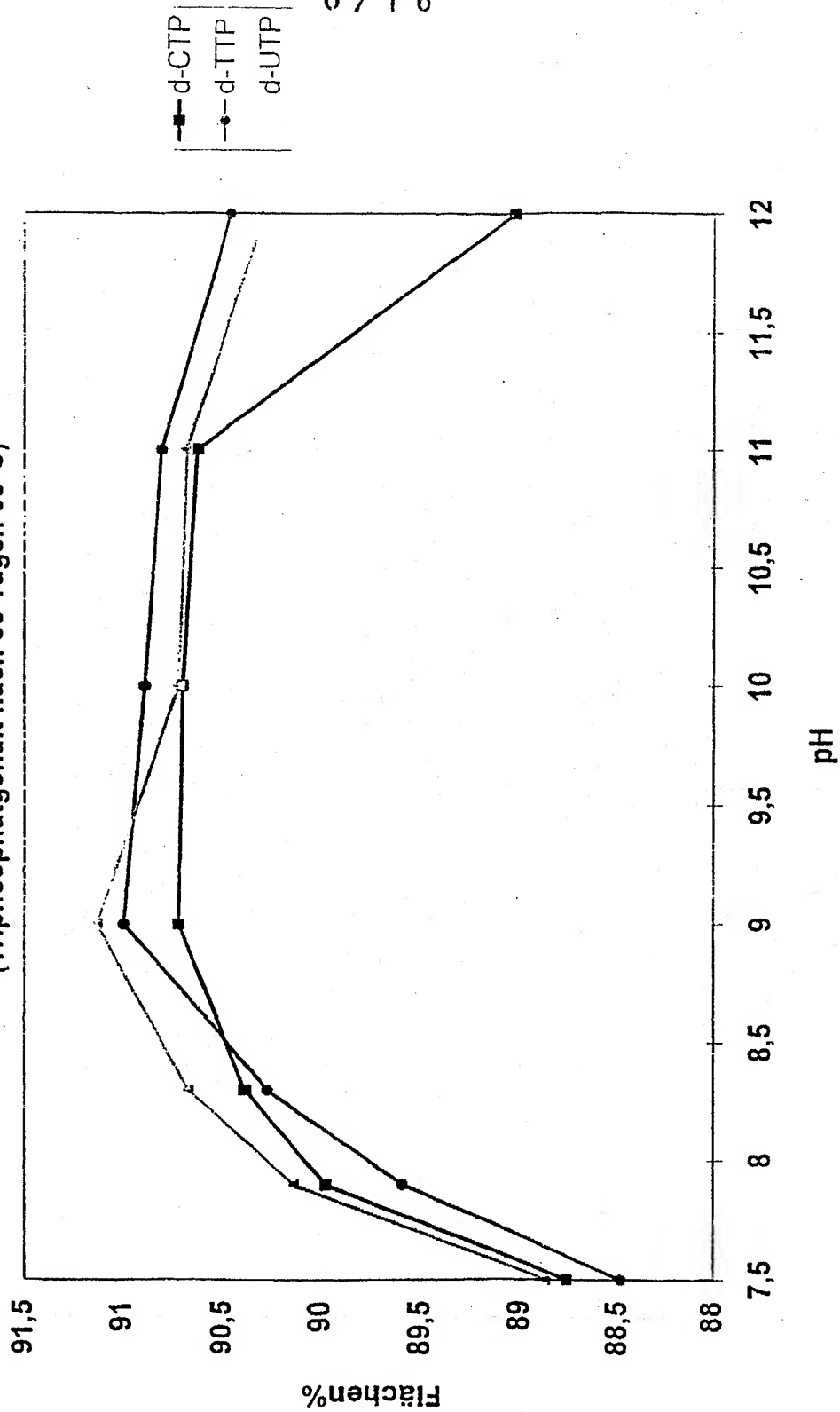
5 / 1 6

Abb. 5
Abnahme d-ATP



6 / 1 6

Abb. 6
pH-Optimum von d-NTPs
(Triphosphatgehalt nach 35 Tagen 35°C)



7 / 1 6

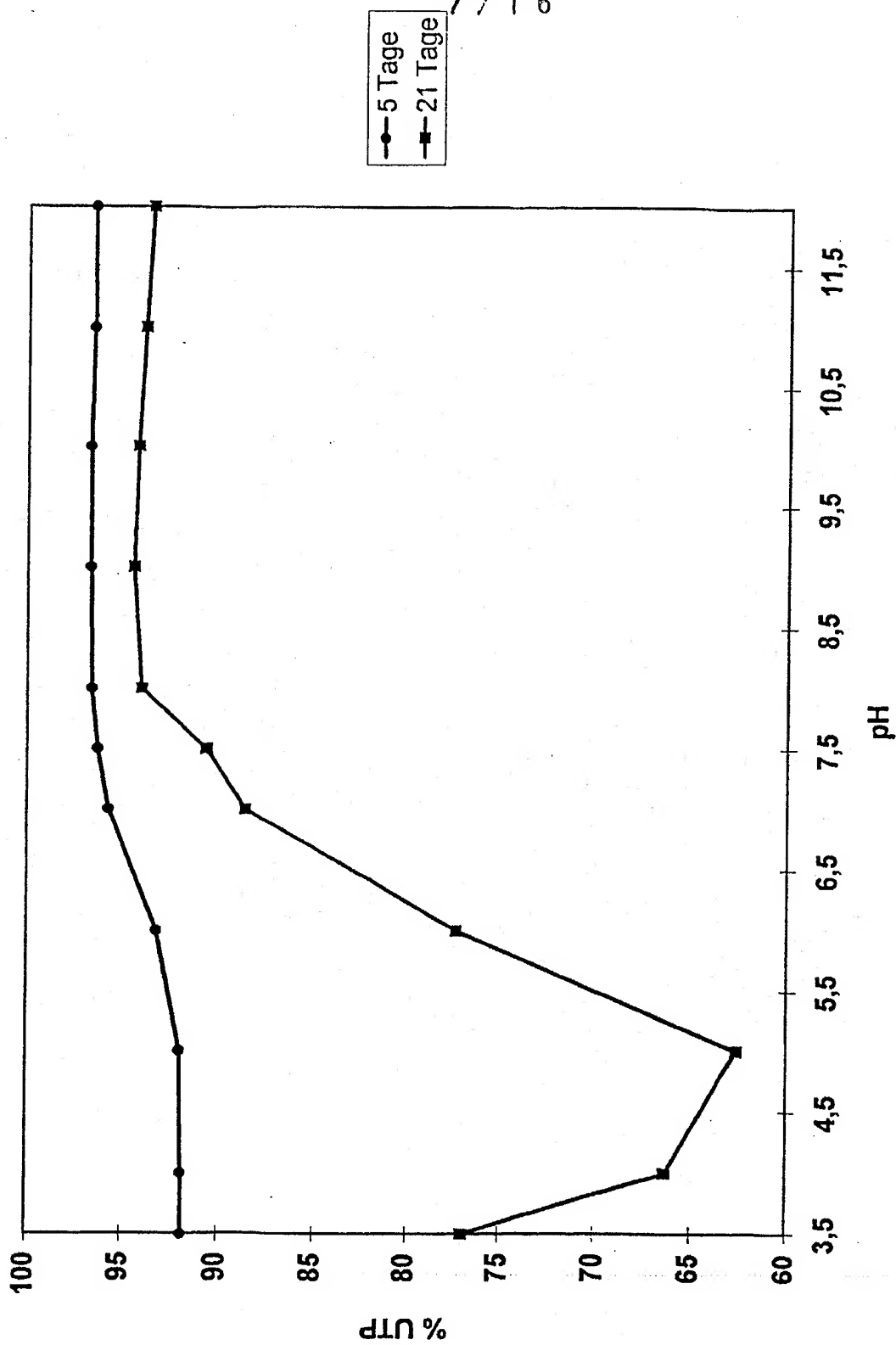
Abb. 7
pH-Stabilität UTP

Abb. 8
Stabilität UDP

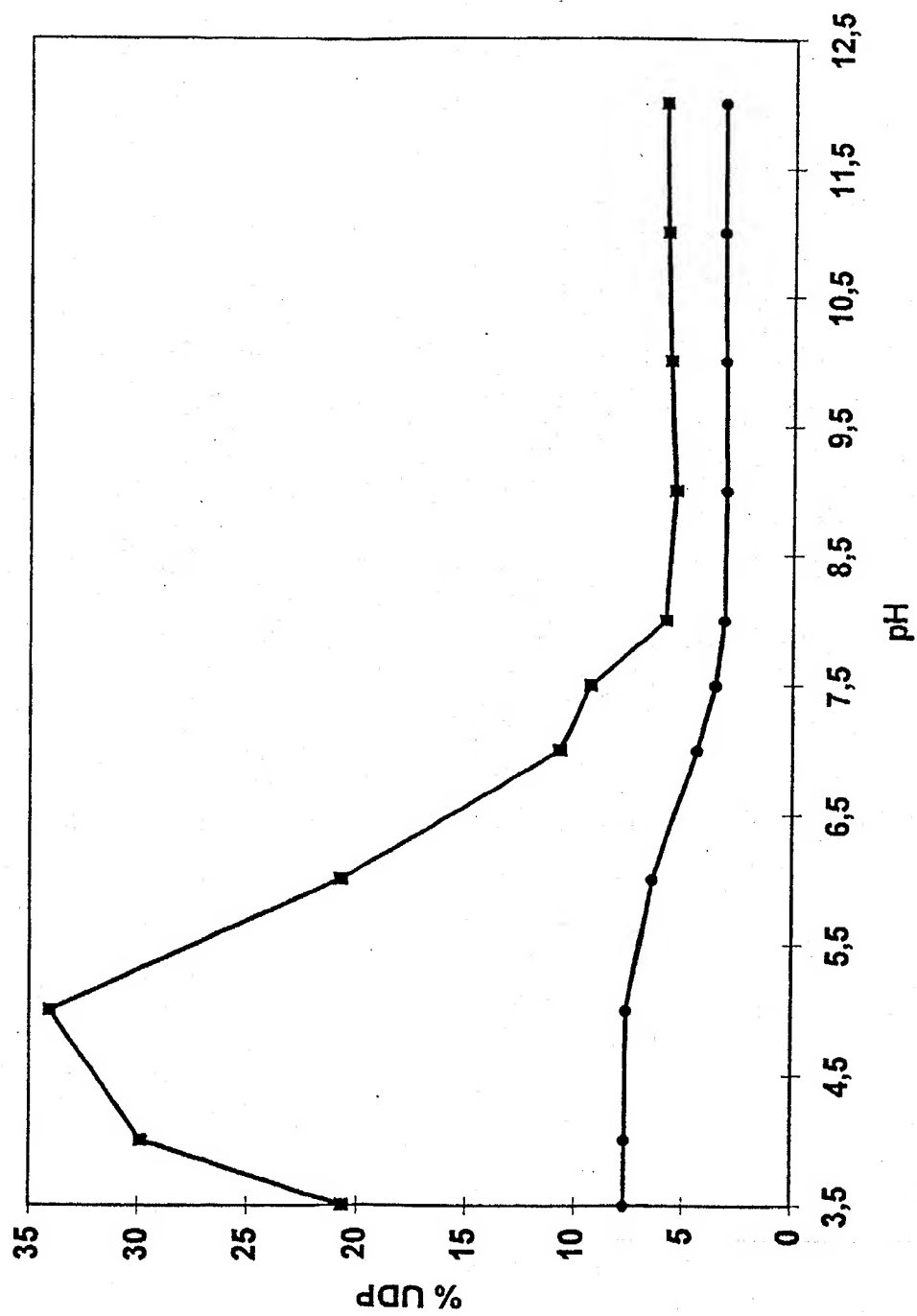


Abb. 9
Stabilität ATP

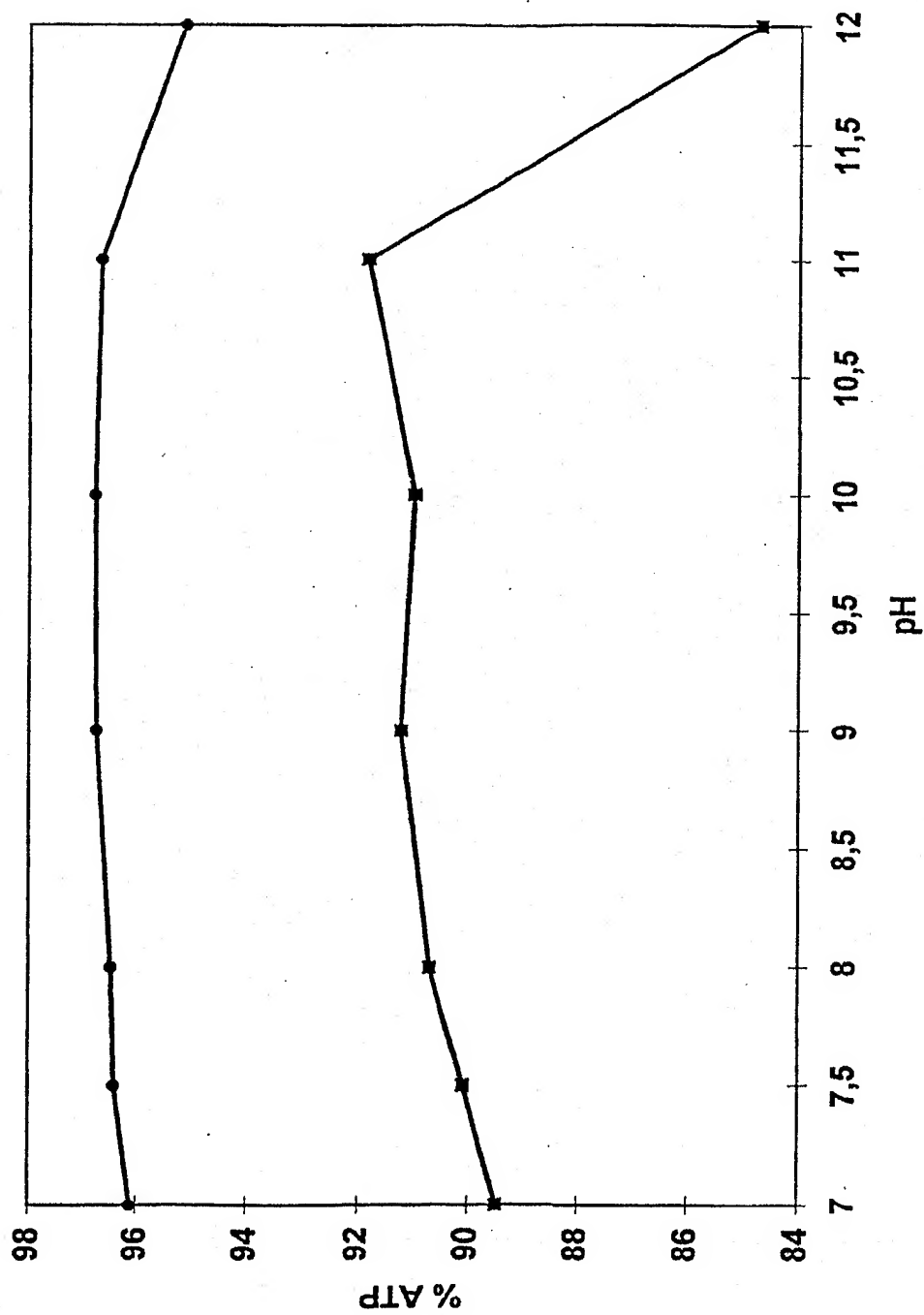


Abb. 10
Stabilität ADP

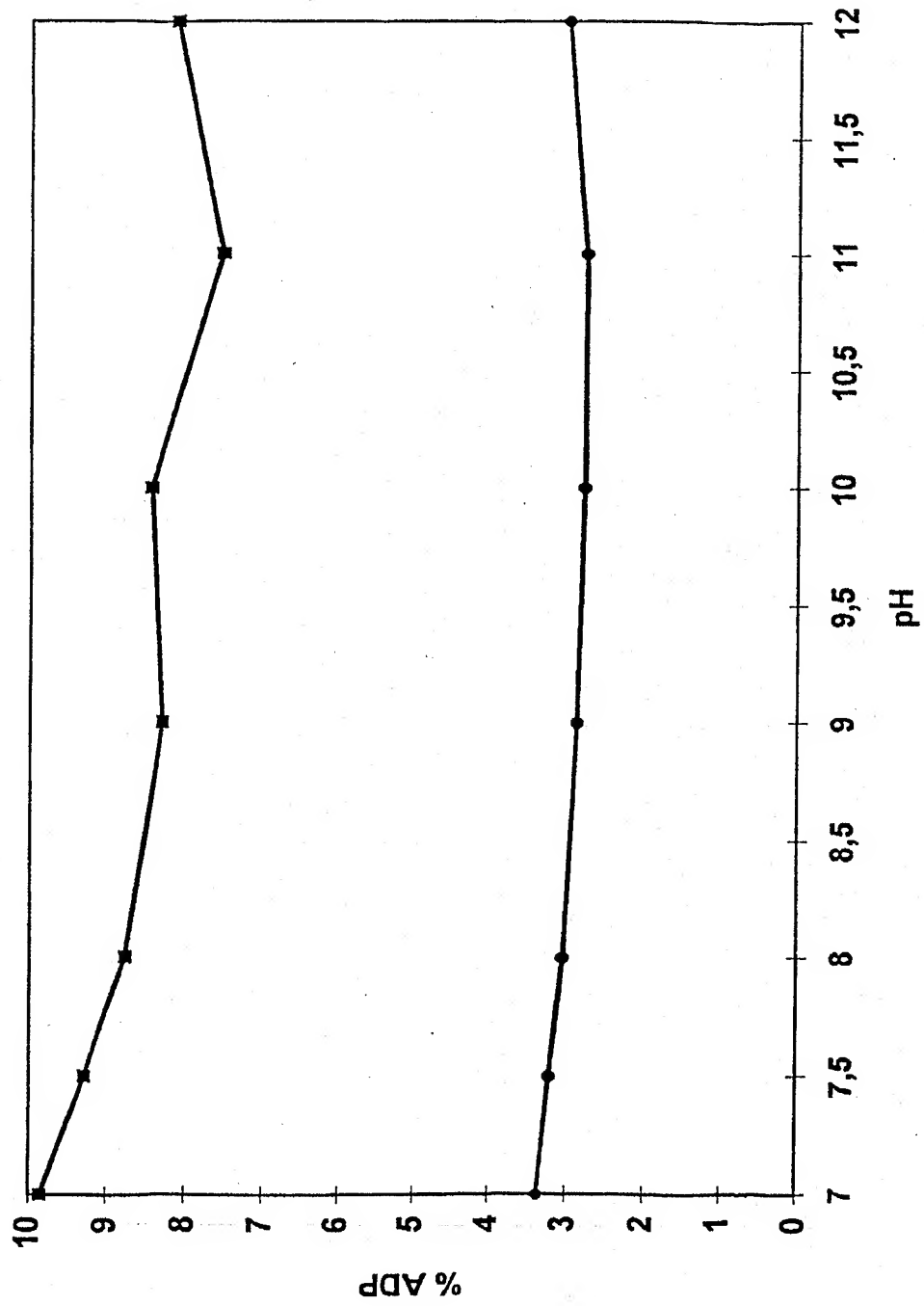


Abb. 11
Stabilität 7-deaza-d-GTP

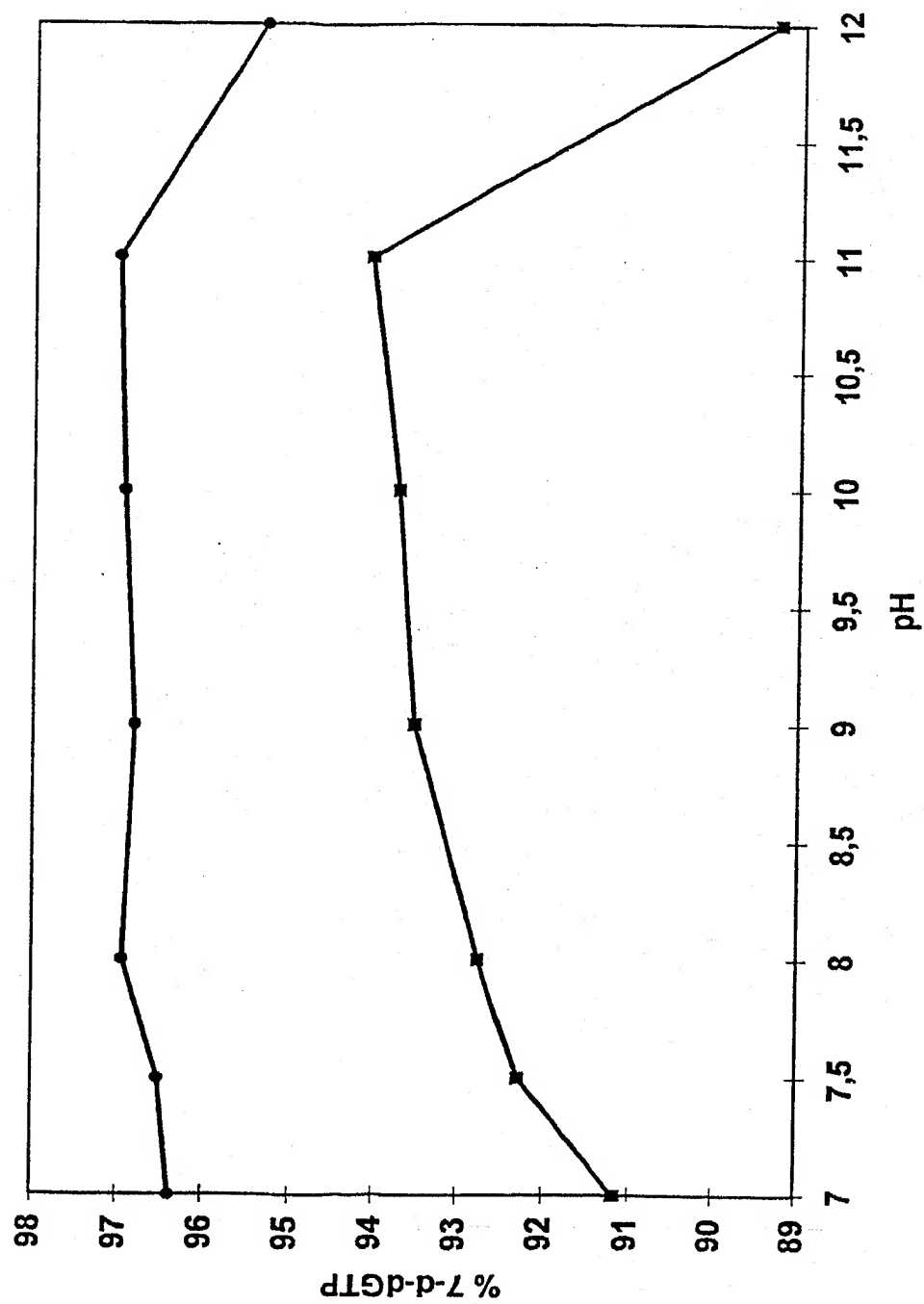


Abb. 12
Stabilität 7-deaza-d-GTP

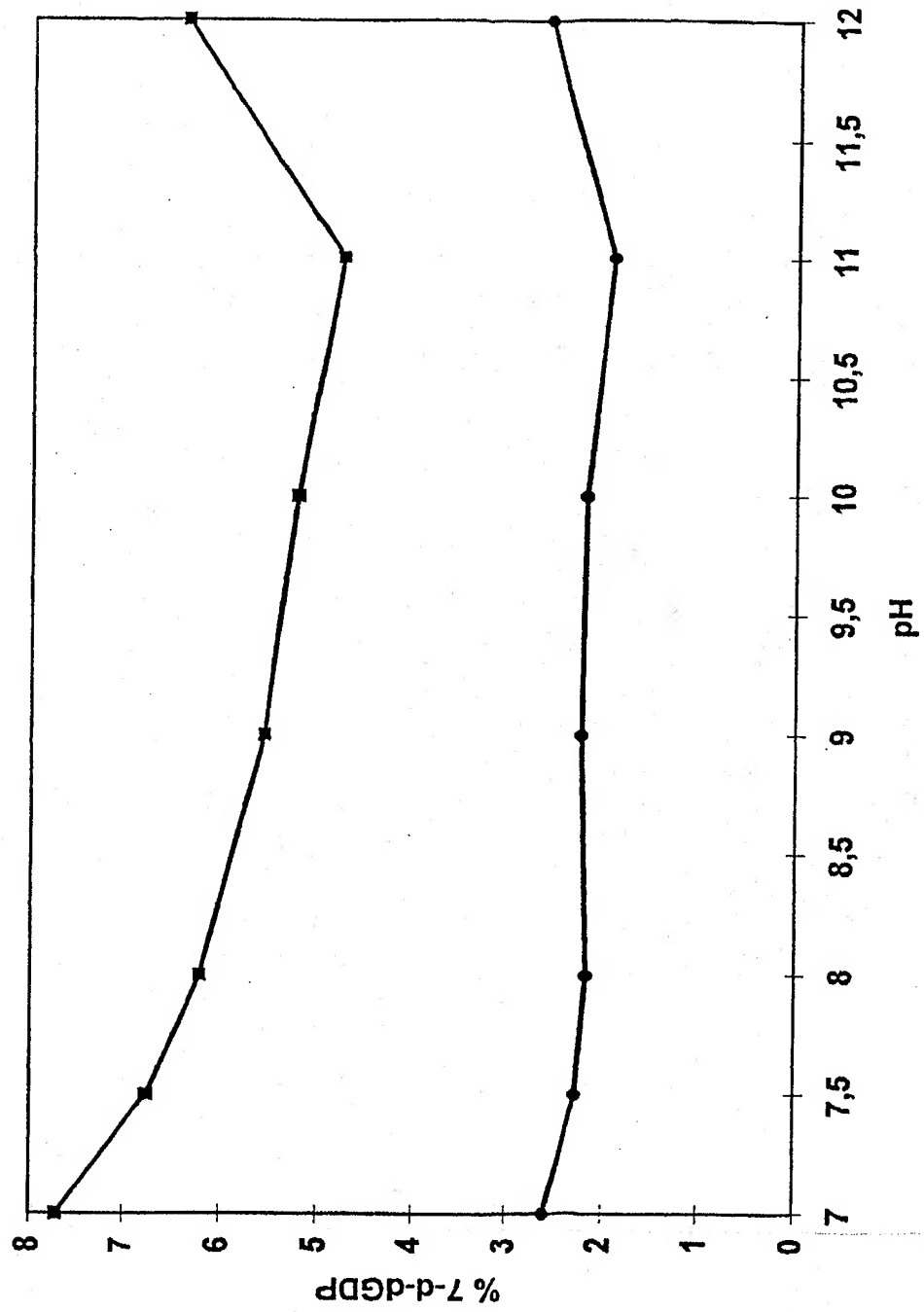
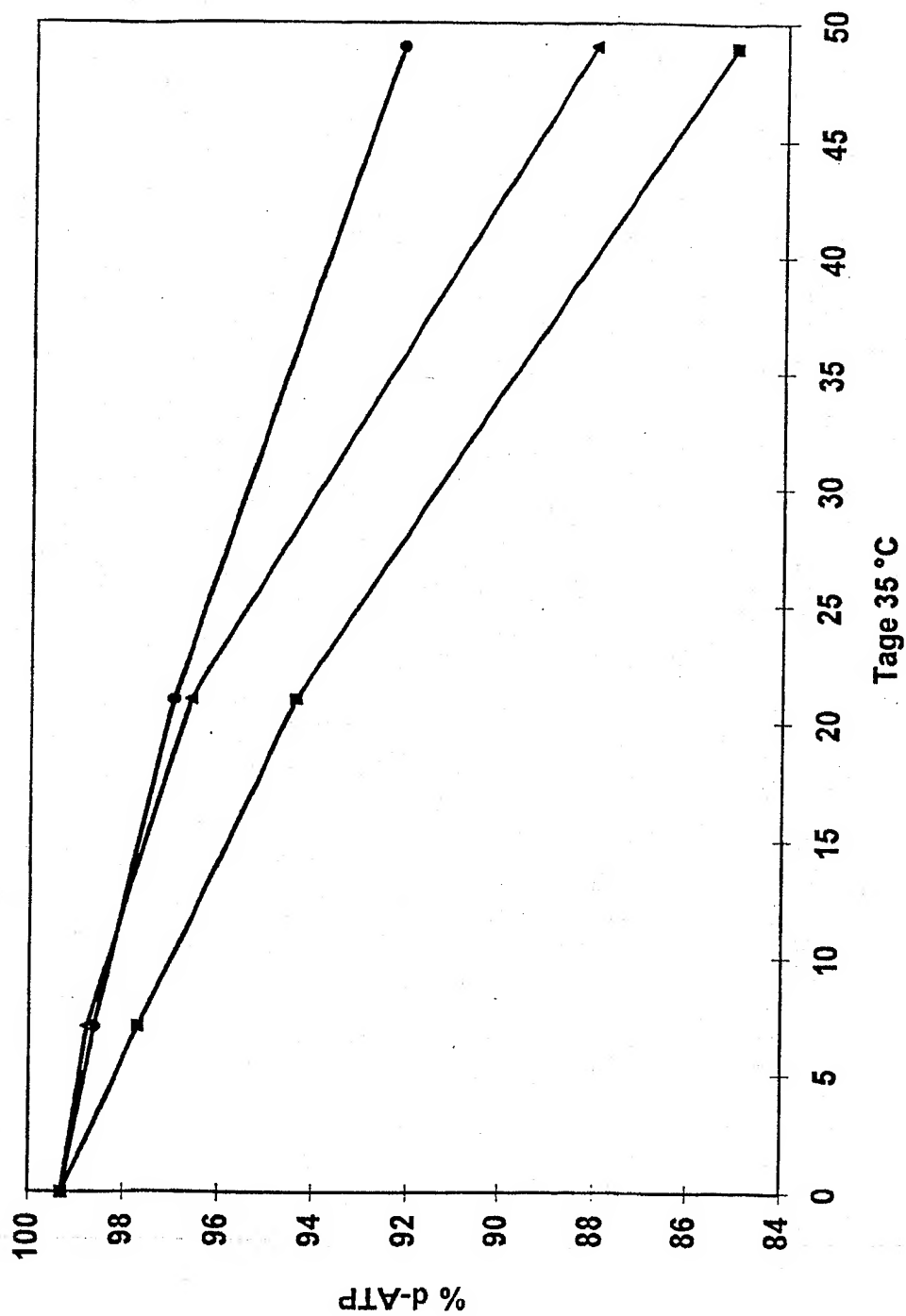
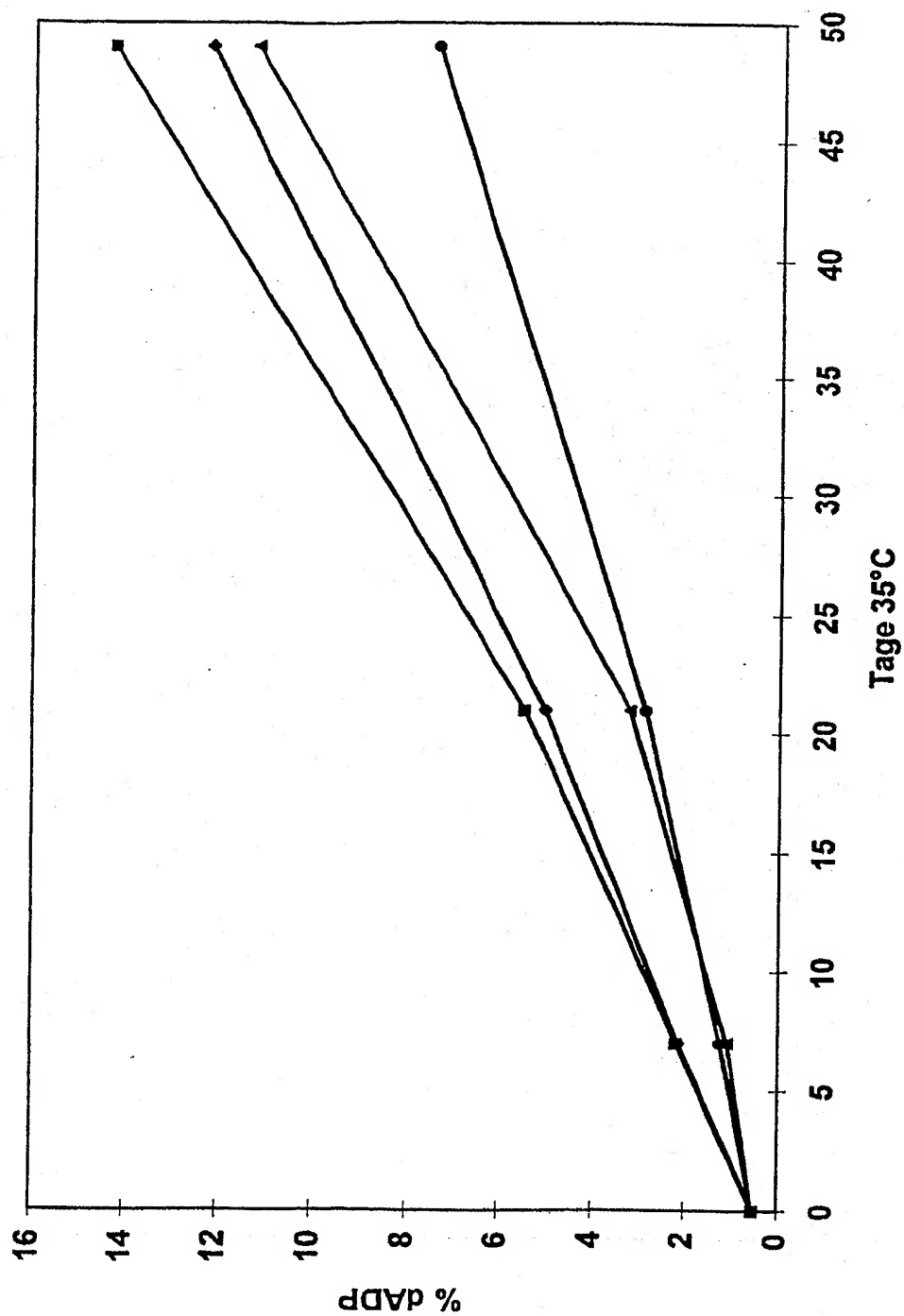


Abb. 13
Stabilität dATP bei Verdünnung



14 / 16

Abb. 14
Stabilität dATP

15 / 16

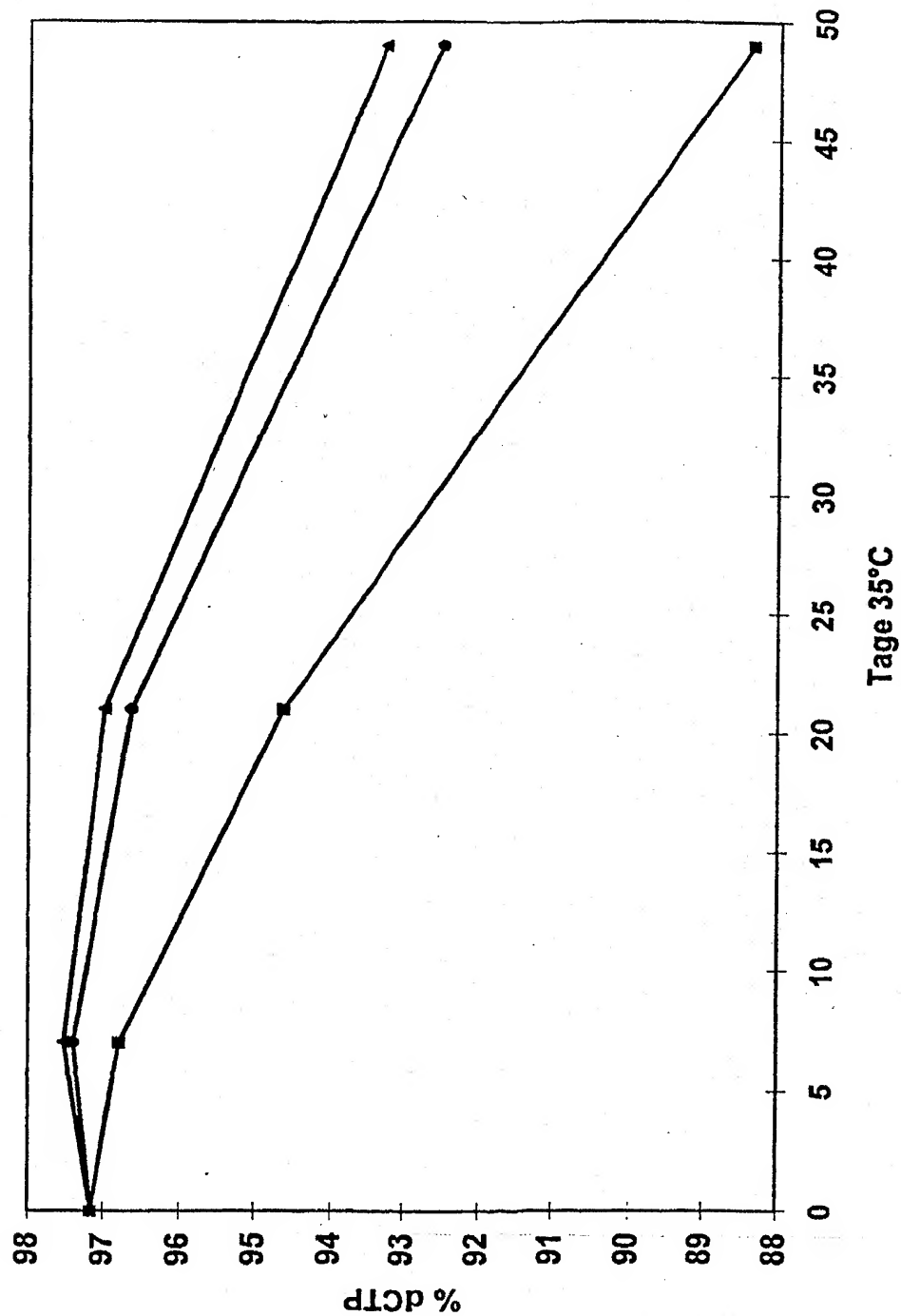
Abb. 15
Stabilität dCTP

Abb. 16
Stabilität dCTP

